

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Hensel

Eine verbesserte Methode zur Bestimmung des Fließverhaltens einzelner Erythrozyten durch eine kurze $4\mu\text{m}$ - Kapillare

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Dr. rer. physiol. Klaus-Henning Hübener
aus Halle/Saale

Marburg 1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Hensel

Eine verbesserte Methode zur Bestimmung des Fließverhaltens einzelner Erythrozyten durch eine kurze $4\mu\text{m}$ - Kapillare

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
im Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Dr.rer.physiol. Klaus-Henning Hübener
aus Halle/Saale

Marburg 1974



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 29.3.74

Dekan: Prof. Dr. Oepen

Referent: Prof. Dr. D. Braasch

Correferent: Prof. Dr. H. Fruhstorfer

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	5
II. Meßmethode	6
1.Prizip der Meßmethode und mecha- nischer Aufbau	6
2.Elektrischer Schaltkreis	8
3.Meßkapillaren	15
4.Blutaufbereitung	16
III. Ergebnisse	18
1.Standardabweichung der Meßmethode	18
2.Normalwerte für normale biconcave Erythrozyten	18
3.Druck	19
4.Temperatur	20
5.Osmolarität	21
6.pH	23
7.Geschwindigkeit der Erythrozyten	24
IV. Literaturverzeichnis	25

I. Einleitung

Die leichte Verformbarkeit der roten Blutkörperchen wurde erstmalig von LEEUWENHOEK in den Schwanzgefäßen der Kaulquappe beobachtet. Die gute Flexibilität ist eine notwendige Voraussetzung dafür, daß eine Passage der Erythrozyten durch die dünnen Kapillaren der Endstrombahn möglich und die Sauerstoffversorgung der Gewebe gesichert wird.

In verschiedenen früheren Arbeiten haben BRAASCH (1,2), WEED (6) et al. gezeigt, daß die Einwirkung von oberflächenaktiven Substanzen als auch Pharmaka ebenso wie Schwellung und Schrumpfung der Erythrozyten nicht nur zu einer Veränderung der normalen biconcaven Form führt, sondern auch die Viskosität von Erythrozytensuspensionen erhöht. Die bei den angewandten Meßverfahren auftretende interzelluläre Reibung und die Abhängigkeit der Viskosität vom gewählten Hämatokrit lassen nur Aussagen zu, die für Erythrozytensuspensionen Gültigkeit haben; sie erlauben jedoch keine sicheren Rückschlüsse auf die Fließeigenschaft einzelner roter Blutkörperchen.

Eine von BRAASCH (3) angegebene Methode, die es ermöglicht, auch an einzelnen Erythrozyten Messungen ihrer Deformierbarkeit vorzunehmen, schien prinzipiell geeignet, in ihrer Handhabung jedoch schwierig und unsicher. Zudem erwies sich die Auswertung der Meßergebnisse als mühselig und zeitaufwendig, so daß die Durchführung umfangreicher Meßprogramme unter vergleichbaren Voraussetzungen nicht möglich war.

Zweck dieser Arbeit war es, aufbauend auf der Methode von BRAASCH, eine Weiterentwicklung anzustreben, die sichere, reproduzierbare Messungen bei wesentlich vereinfachter Auswertung der Meßergebnisse ermöglicht. Um die Leistungsfähigkeit der verbesserten Methode zu bestimmen, wurden die Standardabweichungen der Meßgrößen bestimmt und der Ein-

fluß verschiedener Parameter wie Druck, Temperatur, Osmolarität und pH auf das Fließverhalten untersucht.

II. Meßmethode

1. Prinzip der Meßmethode und mechanischer Aufbau der Apparatur

Rote Blutkörperchen werden einzeln durch einen geringen Unterdruck durch eine kurze Kapillare gesaugt, die einen so geringen Durchmesser aufweist, daß sich die Erythrozyten während der Passage verformen müssen. Gut verformbare Zellen benötigen eine kürzere Passagezeit als solche, die wenig flexibel sind. Die Passagezeit ist daher ein Maß für die Verformbarkeit der Erythrozyten.

Die Passagezeit wird elektronisch gemessen. Dazu wird an die Kapillarstrecke eine elektrische Gleichspannung angelegt. Durch den Unterdruck angesaugte Erythrozyten, die einen sehr hohen elektrischen Eigenwiderstand haben, erhöhen während der Passage die Impedanz der Kapillarstrecke sehr stark, da sie die Elektrolytstrecke in der Kapillare weitgehend unterbrechen. Dadurch wird die elektrische Spannung am Spannungsteiler (s. Abb.1) rasch erhöht und als elektrischer Impuls in den Eingang eines Wechselspannungsverstärkers eingespeist. Nachdem der Erythrozyt die Kapillarstrecke passiert hat, fällt die Spannung wieder auf das elektrische Ausgangspotential, so daß ein Impuls hervorgerufen wird, dessen Dauer proportional zur Passagezeit ist.

Wie in Abb. 1 gezeigt, wird der notwendige Unterdruck zum Ansaugen der Erythrozyten dadurch erzeugt, daß aus Behälter B (in dem zunächst der gleiche Wasserstand eingestellt ist wie in Behälter A) ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen

entnommen wird. Der Innendurchmesser des Behälters B ist mit 35,7 mm $\varnothing$ so ausgelegt, daß eine Entnahme von 1 ml Ringerlösung, mit der das gesamte System gefüllt ist, einen Unterdruck von $\Delta p = 1$ mm Wassersäule (WS) hervorruft.

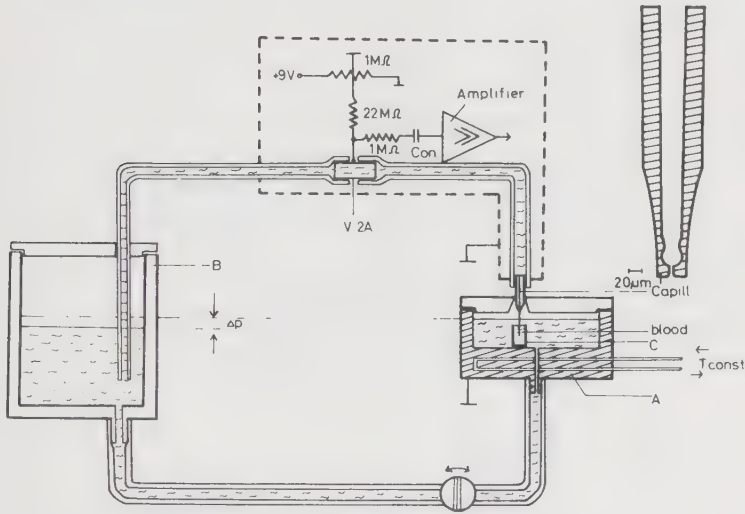


Abb. 1: Schematische Darstellung der mechanischen Meßanordnung. A = vernickelter Messingbehälter, mit Thermostat auf konstante Temperatur einstellbar, B = Behälter zur Einstellung des gewählten Unterdrucks, C = Hohlzylinder, der die zu untersuchende Blutprobe aufnimmt; die Kapillare ist separat stark vergrößert dargestellt; V2A = ein Röhrchen aus Edelstahl, das Abnahmestelle der elektrischen Spannung ist, die fast vollständig an der Kapillarstrecke abfällt. Amplifier = hochohmiger Wechselspannungsverstärker; 1 MΩ = Schutzwiderstand, 22 MΩ = Widerstand des Spannungsteilers

Behälter A, der aus vernickeltem Messing hergestellt ist, enthält ein Rohrsystem, durch das mit Hilfe eines Thermostaten der Behälter wie auch das Blut auf einer definier-

ten und konstanten Temperatur gehalten werden können.

Der auf den Boden des Behälters A aufgelötete kleine Hohlzylinder C dient der Aufnahme der Erythrozyten-Plasma-Suspension, die anschließend mit Ringerlösung dünn überschichtet wird, um den erwünschten Druck Δp über die kommunizierende Schlauchverbindung genau einstellen zu können.

Die Flüssigkeitssäule vom Boden des Behälters A, der geerdet ist, über die Kapillarstrecke bis zu dem Metallröhrchen aus V2A-Stahl ist ein Teil des Spannungsteilers; dessen zweiter Teil wird durch den Festwiderstand von 22 MO repräsentiert und ist mit der Gleichspannungsquelle mit einstellbarer Spannung verbunden. Diese Anordnung muß, um Störungen durch Einstreuimpulse unwirksam zu machen, abgeschirmt und auf Erdpotential gelegt werden.

2. Elektrischer Schaltkreis

Die Entwicklung der in Abb. 2 dargestellten elektronischen Schaltung war eine Hauptaufgabe dieser Arbeit; sie sollte eine rasche und verlässliche Verarbeitung der am Spannungsteiler entstehenden elektrischen Impulse gewährleisten und eine automatische Einordnung verschiedener Impulslängen, korreliert zu bestimmten Verformbarkeiten der Erythrozyten, vornehmen.

Die Einordnung verschiedener Impulslängen sollte in verschiedene Klassen erfolgen, so daß Impulse mit wenig unterschiedener Dauer in einer solchen Klasse gesammelt werden. Die Schaltung wurde so ausgelegt, daß bei jeder Messung jeweils neun Klassen, entsprechend neun Flexibilitätsstufen zur Verfügung stehen, in die die Impulse entsprechend ihrer Dauer einsortiert werden. Dadurch wird, wenn eine große Zahl (über 100) von Erythrozyten vermessen wird, eine Verteilungsfunktion der Passagezeiten in Form eines Histogramms aufgenommen.

Da während der Passage eines roten Blutkörperchens der elektrische Widerstand in diesem Stromkreis stark ansteigt, wird der Erythrozyt selbst nur von einem Strom $I < 1 \text{ nA}$ in der Passagezeit durchflossen. Die elektrische Leistung, die in dieser Zeit ($t \approx 30 \text{ msec}$) vom Erythrozyten aufgenommen werden muß, führt zu einer jouleschen Erwärmung von weniger als $0,1 \text{ K}$, ein Temperaturgradient, der keinen wesentlichen Einfluß auf das Fließverhalten mit sich bringt.

Die durch die Erythrozytenpassage verursachten Impulse ('spikes') müssen zur weiteren elektronischen Verarbeitung zunächst verstärkt werden. Die spikes, die im extrem hochohmigen Stromkreis des Spannungsteilers entstehen, besitzen eine Amplitude von etwa $V_{ss} = 50 \text{ mV}$. Um eine Verfälschung der Impulsform zu vermeiden, muß der Wechselspannungsverstärker C (Abb. 2) mit einem hochohmigen Eingang versehen werden. Dies wurde durch eine MOSFET-Eingangsstufe erreicht ($R_{\text{ein}} = 10^{12} \text{ Ohm}$). Die untere Grenzfrequenz muß dabei sehr niedrig liegen, damit Impulse mit zeitlichen Dauern bis zu 1 sec noch fehlerfrei verarbeitet werden können. Alle Koppelkondensatoren des Verstärkers C wurden entsprechend groß dimensioniert. Der MOSFET-Verstärker C weist einen Verstärkungsfaktor $V = 100$ auf und enthält am Ausgang eine Impedanzwandlerstufe, die eine verlustfreie Anpassung an die nachfolgenden niederohmigen Schaltkreise ermöglicht.

Meßstromkreis und Wechselspannungsverstärker C werden durch Batterien gespeist, um mögliche Brummeinstreuungen über das Wechselstromnetz zu vermeiden. Obwohl die Stromentnahme aus den Batterien gering ist, muß dafür Sorge getragen werden, daß ein Spannungsabfall nicht zu einer Verfälschung des Meßergebnisses führt. Deshalb kann durch einen Umschalter ein

hochkonstanter Sägezahngenerator B an den Eingang des Wechselspannungsverstärkers C angeschaltet werden, dessen Amplitude stabilisiert ist und der bei konstanter Verstärkung ein definiertes Signal am Verstärkerausgang liefert. Ein Spannungsabfall an der Batterie kann damit durch Erhöhung der Verstärkung V unter Kontrolle des Sägezahngenerators kompensiert werden.

Die verstärkten Impulse können auf dem Schirm eines Oszilloskops D sichtbar gemacht werden; ein akustisches Signal I, das von jedem Meßimpuls getriggert wird, ermöglicht eine Betriebskontrolle ohne ständige Aufsicht.

Die weitere elektronische Verarbeitung des Impulses setzt voraus, daß dieser eine Rechteckform erhält, da nur steilflankige Impulse von integrierten Schaltkreisen, die im weiteren ausschließlich verwendet wurden, akzeptiert werden. Für diese Umwandlung sorgt der SCHMITT-Trigger E (Abb. 2). Er weist eine einstellbare Hysterese, variable Einschalt-schwelle und niedrigen Ausgangswiderstand auf. Der an seinem Ausgang erscheinende Rechteckimpuls hat eine Flankensteilheit von 100 nsec; und seine Länge ins der Dauer des eingespeisten Impulses streng proportional.

Jeder dieser transformierten Meßimpulse gelangt auf das NAND- GATTER K und öffnet dieses Tor für die Dauer des Impulses. Nur während dieser Zeitdauer können auch die Impulse eines freilaufenden Rechteckgenerators N das Tor K passieren. Die Frequenz dieses Generators ist sehr konstant aber in Stufen veränderlich und wird so gewählt, daß während der Zeit, in der das Gatter K durch den Meßimpuls geöffnet wird, zwischen einem und neun Impulsen das Tor passieren, entsprechend der jeweiligen Länge des Meßimpulses. Das in seiner Dauer zeitanaloge Meßsignal wird dadurch in eine zeitliche Impulsfolge zerlegt, d.h. es findet eine Analog-Digital-Um-

wandlung statt, die eine genauere und besser reproduzierbare Auswertung der Impulslängen ermöglicht als andere Meßverfahren.

Während einer Messung wird die Zeitbasis des Rechteckgenerators N konstant gehalten. Werden andere Parameter bei der Messung gewählt (Druck, Osmolarität, Temperatur o.a.), so ist es ggf. notwendig, die Frequenz des Generators N so zu verstellen, daß die Mehrzahl der Meßimpulse nach der Analog-Digital-Umwandlung in 5 Einzelimpulse zerlegt werden. Es reicht dazu aus, die konstante Generatorfrequenz in acht Stufen durch acht bistabile Multivibratoren (Flip-Flops) zu teilen und eine so gewonnene Frequenz einzustellen. Um ein gleiches Tastverhältnis der Rechteckimpulse zu erhalten, ist den Untersetzungsstufen ein monostabiler Multivibrator mit einer Eigenzeit $t_e = 10 \mu\text{sec}$ nachgeschaltet (L). Der so variierebare Frequenzbereich ermöglicht es, Meßimpulse mit Impulsdauern zwischen 0,6 msec und 1,5 sec zu verarbeiten.

Die das Tor K passierende Impulsfolge wird im nachgeschalteten binären Dezimalzähler W gezählt und durch den verbundenen Konverter Q in eine dezimale Form umgewandelt. Am Ende des Meßimpulses haben Zähler W und Konverter Q bis zu einer, durch die Impulslänge bestimmten, Zahl gezählt und nur der eine, dieser Zahl zugeordnete Ausgang des Konverters Q hat zu diesem Zeitpunkt sein elektrisches Potential (logischen Zustand) geändert. Obwohl die neun Ausgänge des Konverters Q jeweils mit einem NAND-GATTER R_i verbunden sind, wird nur das eine Tor, dessen Eingang mit dem Anschluß des Konverters Q, dessen Ausgang seinen logischen Zustand geändert hat, geöffnet.

Ein durch die abfallende Flanke des Meßimpulses getriggelter kurzer Impuls ($t = 10 \mu\text{sec}$) vom monostabilen Multivibrator G gelangt nun ebenfalls synchron an die Eingänge aller neun NAND-GATTER R_i . Dieser 'READ'-Impuls kann jedoch auch wiederum nur das eine Gatter passieren, welches zuvor durch den Potentialsprung des einen Konverterausgangs geöffnet wor-

den war. Somit gelangt nur bei diesem einen Tor ein Impuls an den Torausgang und damit an den Eingang des zugeordneten 2 1/2-stelligen Impulszählers SVT_1 und erhöht dessen Zählerstand um 'Eins'. An jedem der neun Torausgänge ist ein solcher Impulszähler vorhanden, der den jeweiligen Zählerstand (Meßimpulse bestimmter Dauer) numerisch angibt. Die maximale Zählkapazität pro Zähler ist 199, ein Überlauf wird angezeigt.

Nachdem durch den Leseimpuls ('READ') der entsprechende Zählerstand um 'Eins' erhöht worden ist, ist die Messung dieses Impulses beendet. Ein weiterer monostabiler Multivibrator H, der durch die abfallende Flanke des Leseimpulses getriggert wird, setzt durch den Impuls 'RESET' den Zählerstand von Zähler W und Konverter Q auf 'Null', so daß die Registrierung eines folgenden Meßimpulses mit dem Zählerstand 'Null' beginnen kann.

Werden mehr als neun Impulse in den Zähler W eingespeist, so zählt dieser erneut von 'Null' an aufwärts und würde das Meßergebnis verfälschen, wenn nicht dafür gesorgt wäre, daß ein solcher Meßimpuls nicht registriert wird. Dies geschieht dadurch, daß bei Überschreitung von neun Impulsen in Zähler W (dessen Ausgang D seinen logischen Zustand dabei ändert), ein bistabiler Multivibrator P gesetzt wird, dessen Ausgangsimpuls über das Gatter F die Registrierung dieses Impulses durch Unterdrückung des 'READ'-Impulses verhindert. Erst der folgende Meßimpuls hebt diese Blockierung wieder auf. Die Sperrung des Gatters F wird zusätzlich durch eine Signallampe U angezeigt. Leuchtet diese Lampe häufig auf, zeigt dies, daß die Länge der Meßimpulse in Relation zur eingestellten Frequenz des Rechteckgenerators N zu groß ist und daß die Zeitbasis des Generators N auf eine kleinere Frequenz eingestellt werden muß.

Um vergleichbare Verteilungsfunktionen der Passagezeiten zu

erhalten, ist es sinnvoll, jeweils gleichgroße Kollektive von Erythrozyten zu untersuchen. Dazu kann mit dem Verwählzähler M eine Zahl von Meßimpulsen eingestellt werden, bei deren Erreichen die Registrierung durch Blockieren des Gatters K beendet wird.

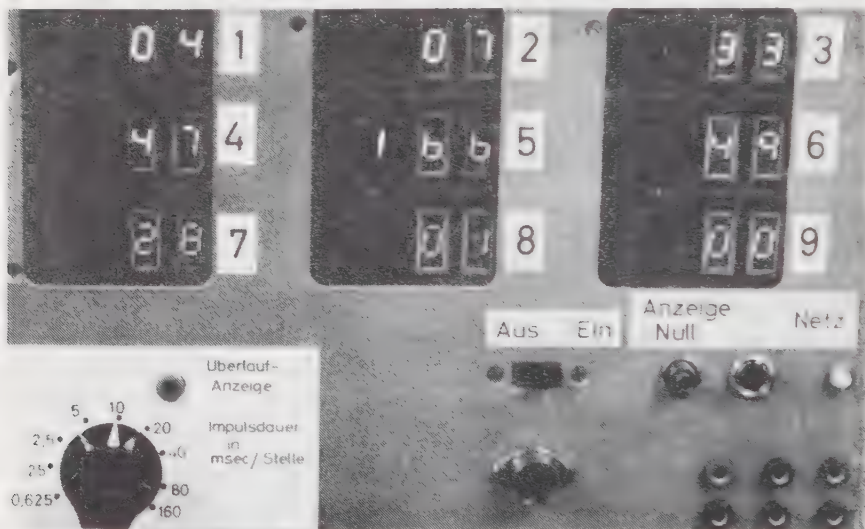


Foto 1: Bild der Zählordnung. Durch die neun Zählerstände 1- 9 und die Zeitbasis (hier auf 10 msec/Stelle eingestellt), läßt sich leicht ein neunstufiges Histogramm der Passagezeiten aufzeichnen. Die erste Stelle gibt die Anzahl der Meßimpulse mit Impulsdauern zwischen 10 und 19 msec an, die anderen Stellen 2-8 jeweils das entsprechende vervielfachte Zeitintervall der eingestellten Zeitbasis. Deutlich ist die Überlaufanzeige U zu erkennen

Am Ende jeder Messung erhält man somit eine Verteilungsfunktion der Passagezeiten, die sich aus den Inhalten der neun Zählerstände und der Zeitbasis, wie in Foto 1 gezeigt, ablesen läßt und als Histogramm leicht darzustellen ist (siehe auch Abb. 6)

3. Meßkapillaren

Um die Verformbarkeit der Erythrozyten nach der hier beschriebenen Methode zu messen, werden besondere Mikrokapillaren benötigt, die zwei Bedingungen erfüllen müssen: 1. der Durchmesser der Meßstrecke muß klein genug sein, um eine Verformung der Zelle zu erreichen, aber groß genug, um eine Verstopfung der Kapillare zu verhindern; 2. die Länge der Meßstrecke muß in der Größenordnung von $20\text{ }\mu\text{m}$ liegen, damit immer nur eine einzelne Zelle die Meßstrecke passiert und den Spannungsimpuls bewirkt, d.h. keine Koinzidenzen auftreten.

Die Methode, mit der solche Kapillaren hergestellt werden, wurde von BRAASCH (3) beschrieben und unverändert übernommen.

Da sich auf diese Weise jedoch keine gleichen Kapillaren herstellen lassen, muß dafür gesorgt werden, daß die Messungen mit derselben Meßkapillare durchgeführt werden. Obwohl man durch sorgfältige Aufbereitung des Blutes eine Verstopfung der Kapillarstrecke für Stunden vermeiden kann,

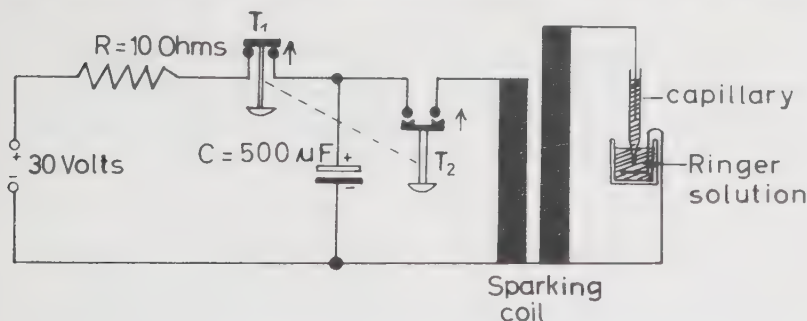


Abb. 3: Vorrichtung zur Reinigung verstopfter Mikrokapillaren: $R = 100\text{ Ohm}$ Schutzwiderstand, T_1, T_2 mechanisch gekoppelte Taster, Sparking coil = PKW- Zündspule

ist eine gelegentliche Verunreinigung und Verstopfung der Kapillarstrecke nicht zu umgehen. Es erwies sich als entscheidend für die Verwendbarkeit der Meßmethode, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem eine Reinigung der Kapillarstrecke sicher ermöglicht wird. Dazu wurde die in Abb. 3 wiedergegebene Anordnung aufgebaut.

Funktion: Kondensator C wird durch einen Gleichstrom aufgeladen, der durch den Schutzwiderstand $R = 10 \text{ Ohm}$ begrenzt wird. Werden die Taster T_1 und T_2 , die mechanisch gekoppelt sind, gedrückt, so entlädt sich Kondensator C sehr schnell über die niederohmige Primärwicklung einer PKW- Zündspule und induziert sekundärseitig eine sehr hohe Spannungsspitze. Diese Induktionsspannung wird über eine Funkenstrecke aufgebaut. Die Funkenstrecke wird durch die Meßkapillare gebildet so daß der Funke die Kapillarstrecke durchschlägt. Die verunreinigte Kapillare wird dadurch bei mehrmaliger Funkenpassage sicher gereinigt. Es ist unbedingt notwendig, eine Kondensatorladung als Spannungsquelle einzusetzen, da ein aus einer Batterie erzeugter Funke eine zu große und schlecht reproduzierbare Energiequantität besitzt und die Kapillare zerstört.

Die bei der Funkenreinigung durch die große Wärmemenge und den hohen Induktionsstrom in der Kapillare entstehenden Gasbläschen lassen sich leicht durch Einsaugen von filtrierter Ringerlösung mit Hilfe einer Spritze entfernen.

4. Blutaufbereitung

Um einer Verstopfung der Meßkapillare vorzubeugen, wird das venös entnommene Blut zunächst defibriniert (mechanisch), danach 10 min lang zentrifugiert. Nach Abnahme des Plasma

werden die Leukozyten mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Eine geringe Menge an Erythrozyten wird dann im Plasma resuspendiert, so daß ein Hämatokrit von etwa 2% eingestellt wird. Der niedrige Hämatokrit ist erforderlich um eine zu rasch aufeinanderfolgende Passage von Erythrozyten durch die Meßkapillare zu vermeiden und damit die Koinzidenzrate möglichst niedrig zu halten.

Die im Plasma resuspendierten Zellen werden danach etwa zehn Mal durch denselben dichten Papierfilter gepumpt. Mit dieser Maßnahme gelingt es meist, Messungen über einige Stunden ohne Verstopfung der Meßkapillare durchzuführen.

Die Verarbeitung des entnommenen Blutes kann innerhalb einer halben Stunde erfolgen.

III. Ergebnisse

Um die Brauchbarkeit der verbesserten Meßmethode zu testen, wurden verschiedene Messungen durchgeführt. Die Standardabweichung σ der Methode, Normalwerte mit ihren Standardabweichungen für normale biconcave Erythrozyten von verschiedenen gesunden Personen sowie der Einfluß der Parameter : Druck (=Passagegeschwindigkeit der roten Blutkörperchen), Temperatur, Osmolarität und pH auf die Verteilungsfunktion der Passagezeiten wurde bestimmt.

1. Standardabweichung der Meßmethode

Ein brauchbarer Parameter, der die Genauigkeit einer Meßmethode beschreibt, ist die Standardabweichung der gemittelten Meßgrößen. Die hier benutzten Mittelwerte sind die Lage des Schwerpunktes der Verteilungsfunktion auf der Abszissenachse und die Breite der Funktionskurve in halbmaximaler Kurvenhöhe. Beide Mittelwerte wurden graphisch aus Meßreihen bestimmt, die mit Erythrozyten derselben Versuchsperson gemessen wurden. Die Standardabweichung beider oben beschriebener Mittelwerte wurde aus 12 Meßreihen, die hintereinander durchgeführt wurden zu $\sigma = \pm 4,1 \%$ berechnet.

2. Normalwerte für normale biconcave Erythrozyten

Um Abweichungen von der physiologisch 'normalen' Zellflexibilität bestimmen und bewerten zu können, müssen zunächst Normalwerte gemessen werden, die als Vergleichsstandard dienen können. Während die Mittelwerte der Meßgrößen selbst durch die Geometrie einer jeden Meßkapillare bestimmt sind, werden die Schwankungsbreiten und damit die Standardabweichungen der Mittelwerte durch apparativ wie physiologisch

bedingte Varianzen verursacht. Zur Bestimmung der Normalwerte wurden Erythrozyten von 12 verschiedenen gesunden männlichen wie weiblichen Versuchspersonen im Alter zwischen 20 und 45 Jahren vermessen. Die Standardabweichungen beider Mittelwerte (Lage des Schwerpunktes der Verteilungsfunktion sowie Breite in halbmaximaler Kurvenhöhe) berechnete sich zu $\sigma = \pm 12,4 \%$.

Wurde derselben Versuchsperson an zehn verschiedenen Tagen Blut entnommen, so ergab sich für die Standardabweichung beider Mittelwerte ein Wert von $\sigma = \pm 6,1 \%$.

Die Mittelwerte für die Lage des Schwerpunktes der Verteilungsfunktionen sind für verschiedene Drucke Δp der Abb. 4 zu entnehmen.

3. Druck

Der eingestellte Unterdruck Δp beeinflusst die Passagezeit der Erythrozyten in starkem Maße. Um optimale Bedingungen für

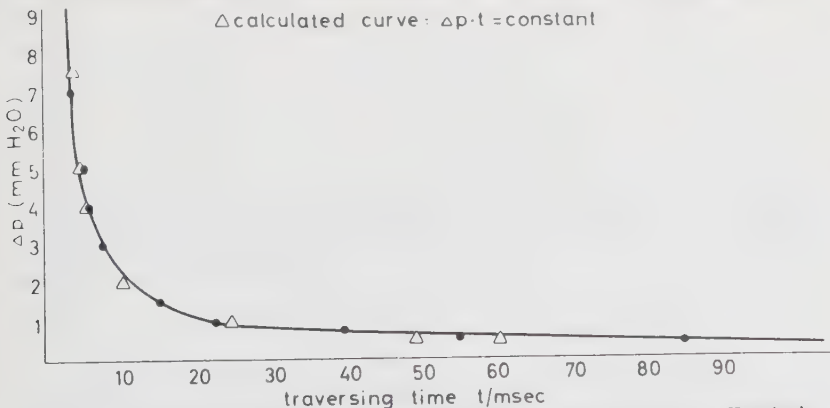


Abb. 4: Abhängigkeit der Lage des Schwerpunktes der Verteilungsfunktionen der Passagezeiten vom eingestellten Unterdruck. Vergleich von Meßwerten mit nach dem HAGEN-POISEUILLE'schen Gesetz berechneten Werten (durch Dreieck gekennzeichnete Werte)

die Wahl einer Standardeinstellung für spätere Messungen zu finden, wurde die Abhängigkeit der Passagezeit vom Unterdruck systematisch untersucht. Wie in Abb. 4 dargestellt, ergibt sich aus dem hyperbolischen Funktionsverlauf eine besonders gute Auflösung von Meßgrößen bei niedrigen Drucken Δp , gleichfalls wird aber auch der relative Meßfehler, der durch die Ungenauigkeit der Druckeinstellung bedingt ist bei abnehmenden Drucken immer größer. Deshalb muß ein Kompromiß zwischen guter Auflösung der Meßgröße und großem Meßfehler eingegangen werden. Als Standarddruck wurde so der Wert $\Delta p = 0,50 \pm 0,02 \text{ mm H}_2\text{O}$ gewählt.

Das Produkt aus Druck und Passagezeit ist konstant wie aus Abb. 4 hervorgeht; d.h. auch für das Fließverhalten einzelner Erythrozyten hat das HAGEN-POISEUILLE-sche Gesetz Geltung, das Durchfließen der Kapillarstrecke kann als laminar angenommen werden.

4. Temperatur

Die Abhängigkeit der Passagezeit bei konstantem Druck (Standardbeingung) von der Temperatur ist in Abb. 5 wiedergegeben. Ein Maximum der temperaturabhängigen Zellflexibilität liegt im Bereich von $T = 42^\circ\text{C}$; diese Beobachtung stimmt gut mit den Viscositätsmessungen von ROTHLIN (5) überein. Bei höheren Temperaturen kommt es zu einem steilen Abfall der Deformierbarkeit, dokumentiert durch einen starken Anstieg der mittleren Passagezeiten. Bei Temperaturen über $T = 49^\circ\text{C}$ werden die Messungen durch das Auftreten von Zellbruchstücken verfälscht.

Um Vergleiche zwischen der temperaturabhängigen Viscositätsänderung von Wasser mit der Passagezeit der Erythrozyten zu ermöglichen (direkte Vergleichsmessungen sind hier für Wasser nicht möglich), wurde die relative Viscosität des Wassers als auch die Passagezeit der Erythrozyten (bei einem Unterdruck

von $\Delta p = 0,50 \text{ mm H}_2\text{O}$) für eine Temperatur $T = 37^\circ\text{C}$ gleich 100 % gesetzt, wie aus Abb. 5 zu ersehen ist. Es wird ausserdem deutlich, daß die starke Abweichung vom temperaturabhängigen Viscositätsgradienten des Wassers nur bei dem niedrigen Druck $\Delta p = 0,50 \text{ mm H}_2\text{O}$ ausgeprägt ist.

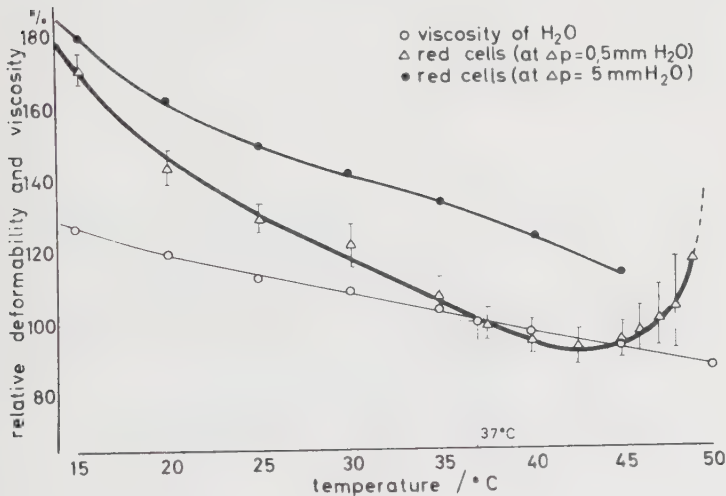


Abb. 5: relative Änderung der Passagezeiten (=Deformierbarkeit) normaler Erythrozyten als Funktion ihrer Temperatur. Im Vergleich dazu die temperaturabhängige Viscositätsänderung von Wasser. Deutlich ist ein Maximum der Passagezeit für den Druck $\Delta p = 0,50 \text{ mm H}_2\text{O}$ bei $T = 42^\circ \text{C}$ zu erkennen.

5. Osmolarität

Zellform und Hämoglobinkonzentration im Inneren des Erythrozyten werden in bekannter Weise durch hypo- bzw. hypertone Lösungen beeinflusst. Hypotone Lösung (hier 0,6 % NaCl)

führt zum Anschwellen der Zelle, nicht aber zur maximalen Schwellung, die keine Deformierung mehr zuließe. Abb. 6 zeigt, daß die Deformierbarkeit dieser Erythrozyten stark abnimmt. Die Verteilungsfunktion der Passagezeiten wird zudem unsymmetrisch im Vergleich zu normalen Verteilungsfunktionen. Die Lage des Schwerpunktes der Verteilungsfunktion, die die Gesamtzahl der registrierten Erythrozyten in zwei Gruppen teilt und den mittleren Wert des Passagezeiten genau beschreibt, verschiebt sich dabei stärker als die Lage des Maximums der Funktionskurve.

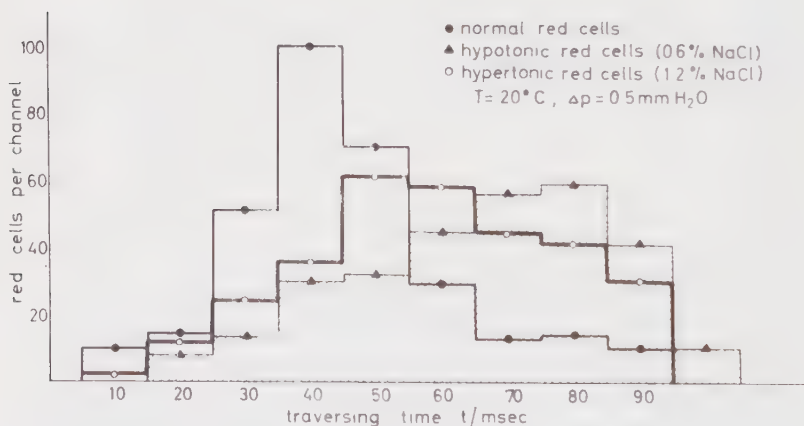


Abb.6: Histogramm der Passagezeiten für normale Erythrozyten (schwarzer Punkt), für hypoton geschwollene (0,6% NaCl) (schwarzes Dreieck) und hyperton geschrumpfte (1,2% NaCl) Zellen (Kreis)

Hypertone Lösung (1,2 % NaCl) transformiert die biconcave Form der Erythrozyten in eine stechapfelförmige geschrumpfte

te Form. Obwohl man auf Grund des verringerten Zellvolumens eine beschleunigte Passagezeit erwarten könnte, ist, wie aus Abb. 6 hervorgeht, auch hier die mittlere Passagezeit deutlich verlängert. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt bei niedrigen Temperaturen und wird gering bei Temperaturen über $T = 35^{\circ}\text{C}$. Gleichzeitig bestätigt diese Messung, daß die Flexibilität der Erythrozyten die Meßgröße bestimmt, weniger das Zellvolumen.

6. pH

Die Erythrozyten wurden dadurch auf einen niedrigen pH -Wert eingestellt, daß die Pufferkapazität der Zelle durch wiederholte Equilibrierung mit CO_2 erschöpft wird. Die so erreichte Einstellung der Wasserstoffionenkonzentration war über einen Zeitraum von zwei Stunden mit $\text{pH} = 6,35 \pm 0,05$ konstant. Passagezeiten, Zellvolumen und Dichte der Erythrozyten sind für normale Zellen bei $\text{pH} = 7,40$ und Zellen bei $\text{pH} = 6,35$ in Tab. 1 einander gegenübergestellt:

Tabelle 1:

pH	Passagezeit $\pm \sigma$	Zellvolumen	Dichte
7,40	$25,2 \pm 1,1$ msec	$90,5 \pm 0,5 \mu\text{m}^3$	$1,1110 \text{ g/cm}^3$
6,35	$28,0 \pm 1,5$ msec	$97,0 \pm 0,5 \mu\text{m}^3$	$1,1040 \text{ g/cm}^3$

Die Zunahme der Passagezeit bei niedrigem pH ist relativ gering und dürfte auf das Fließverhalten in vivo keinen großen Einfluß haben, zumal ein so niedriger pH - Wert unter physiologischen Bedingungen nicht erreicht wird.

7. Geschwindigkeit der Erythrozyten bei Standardbedingungen

Die mittlere Geschwindigkeit der roten Blutkörperchen bei Standardbedingungen kann leicht mit $\bar{v} = l / \bar{t}$ ($\bar{v}$ = mittlere Geschwindigkeit, l = Länge der Kapillarstrecke, $\bar{t}$ = mittlere Passagezeit bei $T = 37^{\circ}\text{C}$ und $\Delta p = 0,50 \text{ mm H}_2\text{O}$) berechnet werden. Benutzt man die gemessenen Werte $l = 20 \mu\text{m}$ und $\bar{t} = 25 \text{ msec}$, so erhält man als mittlere Zellengeschwindigkeit $\bar{v} = 0,8 \text{ mm /sec}$. Dieser Wert stimmt gut mit den Geschwindigkeiten überein, die bei 'in vivo'-Messungen an $3-4 \mu\text{m } \varnothing$ - Kapillaren gemessen wurden ($0,7 \text{ mm/sec}$) (4). Auch der Druck, der auf die Erythrozyten 'in vivo' wirkt, liegt in der Größenordnung der hier benutzten Standard-Druckdifferenz $\Delta p = 0,50 \text{ mm H}_2\text{O}$, so daß in dieser Hinsicht die 'in vivo' - Verhältnisse gut simuliert werden.

Die hier beschriebene Methode erscheint geeignet, das Fließverhalten einzelner Erythrozyten erstmals mit einer guten Genauigkeit zu untersuchen. Die verbesserte Versuchsanordnung erlaubt die Aufnahme von Meßreihen und systematischen Untersuchungen unter gleichen Bedingungen, so daß erstmalig der Einfluß verschiedener Parameter auf das Fließverhalten untersucht werden konnte.

Literaturnachweis :

1. BRAASCH,D.: Veränderung der Erythrozytenform und Blutviscosität durch Galle, freie Fettsäuren und Chlorpromazin. Arch. ges. Physiol. 300, 185-188 (1968)
2. BRAASCH,D.: On the relation between erythrocyte deformability, cell shape and membrane surface tension. Arch. ges. Physiol. 313, 316-320 (1969)
3. BRAASCH,D.: Deformability and traversing time of shape transformed red cells passing through a short 4 μ m glass capillary. Pflügers Arch. 329, 167 - 171 (1971)
4. GANONG : Medizinische Physiologie, Lehrbuch, Springer Verlag Heidelberg. S. 544 (1971)
5. ROTHLIN,E.: Viskosimetrische Studien über den Einfluß der Temperatur auf den Strömungswiderstand des Blutes und dessen Komponenten. Pflügers Arch. 179, 198 - 216, (1920)
6. WEED,R.I., P.L. LACELLE and E.W. MERRILL: Metabolic dependence of red cell deformability. J. clin. Invest. 48, 795 - 809 (1969)

Lebenslauf

Am 28.2.1943 wurde ich als zweiter Sohn des Reichsbahninspektors Wilhelm Hübener und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Spalting in Halle/Saale geboren. Von 1949 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Warburg/Westf., anschließend die Wilhelmschule, Gymnasium für Jungen in Kassel, an der ich 1963 die Reifeprüfung ablegte. Gleich anschließend begann ich in Darmstadt an der Technischen Hochschule das Studium der Physik und wechselte nach bestandem Vordiplom an die Philipps-Universität nach Marburg (1965), wo ich dann meine Diplomprüfung 1967 ablegte. Parallel zur Anfertigung meiner physikalischen Diplomarbeit, die ich 1969 abschloß, begann ich mit dem Studium der Humanmedizin und der Humanbiologie. Nach bestandem Vorphysikum (1968) und Physikum (1970) bestand ich 1973 das medizinische Staatsexamen, nachdem ich 1972 noch das Ergänzungsstudium der Humanbiologie mit Hauptfach Physiologie mit der Promotion zum Dr. rer. physiol. abgeschlossen hatte. Seit August 1973 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Physiologischen Institut mit Arbeiten auf dem Gebiet der Mikrozirkulation beschäftigt. Nach Abschluß meiner Medizinalassistentenzeit, die ich 1974 abschließen möchte, werde ich weiter auf medizinischem Gebiet wissenschaftlich arbeiten.

Dr. Klaus-Henning Hübener

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren
und Dozenten:

In Darmstadt: v. Aretin, Bähr, Becker, Finkenrath, Gärtner,
Graf, Hellwege, Kienle, Klotter, Kogon, Kohl-
schütter, Laugwitz, Lingenberg, Marguerre,
Rang, Scherzer, Schmieden, Schnell, Schultz,
Waidelich, Walther, Woernle.

In Marburg : Capeller, Grawert, Großmann, Kamke, Kuhn, Lud-
(Physik) wig, Madelung, Müller, Schröter, Starke, Walcer,
Wolter.

In Marburg : Berendes, Bommer, Braasch, Brück, Buchholz,
(Medizin) Doelle, Exner, Friedrich, Ganz, Golenhofen,
Graul, Hamelmann, Hensel, Hess, Heuser, Hil-
debrandt, Hort, Jacob, Karlson, Koch, Koecke,
Koransky, Korb, Linneweh, Mann, Martini, Oeh-
mig, Oepen, Petry, Pots, Reim, Rodeck, Rohen,
Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel,
Siegert, Straub, Voss, Wehrmeyer.

Herrn Prof. Dr. D. Braasch danke ich für die Stellung des Themas, für ständige Anregung und Unterstützung bei der Arbeit und für die Durchsicht des Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. H. Hensel danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Physiologischen Institut der Universität Marburg.

Fräulein M. Niermann danke ich für ihre freundliche Hilfe bei den Messungen und bei der Anfertigung der Abbildungen.

